

Anti-aging compositions comprises materials to stimulate neosynthesis of important elements at the dermo-epidermal junction

Patent Number : **FR2813018**

International patents classification : A61K-007/48

• Abstract :

FR2813018 A NOVELTY - Cosmetic compositions comprises at least one material that stimulates the neosynthesis of at least one element that plays an important role at the dermo-epidermal junction.

USE - Anti-skin aging compositions. (Dwg.0/0)

• Publication data :

Patent Family : FR2813018 A1 20020222 DW2002-30 A61K-007/48 39p * AP: 2000FR-0010773 20000821
WO200215869 A1 20020228 DW2002-30 Eng AP: 2001WO-EP09652 20010820 DSNW: JP US DSRW: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR
EP1408925 A1 20040421 DW2004-27 A61K-007/48 Eng FD:
Based on WO200215869 AP: 2001EP-0969626 20010820;
2001WO-EP09652 20010820 DSR: AT BE CH CY DE DK ES FI
FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR
Priority n° : 2000FR-0010773 20000821
Covered countries : 22
Publications count : 3

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (BEIE) BEIERSDORF AG
(BOOT) BOOTS CO PLC
Inventor(s) : BOBIER RC; FRUCTUS A; LE SQUER S;
MARCANTUANI C; MATT A; OGER P; BOBIER-RIVAL C;
MATT A

• Accession codes :

Accession N° : 2002-244000 [30]
Sec. Acc. n° CPI : C2002-073449

• Derwent codes :

Manual code : CPI: B04-A08C2 B04-A10
B04-C01A B04-C02E B04-C03C B14-N17
B14-R01 D08-B09A E04-A E09-B
Derwent Classes : B04 D21 E19
Compound Numbers : RA00HN-K
RA00HN-M R01862-K R01862-M
RA01UM-K RA01UM-M R07175-K
R07175-M RA031D-K RA031D-M
RA0J87-K RA0J87-M R01870-K R01870-M
RA2VCG-K RA2VCG-M RA2S1E-K
RA2S1E-M R18626-K R18626-M R03488-K
R03488-M R18626-K R18626-M
R03488-K R03488-M

• Update codes :

Basic update code :2002-30
Equiv. update code :2002-30; 2004-27

Others :

Technology Abstract

TECHNOLOGY FOCUS

BIOLOGY - Preferred Components: The important elements at the dermo-epidermal layer are laminines, integrine alpha2,beta1, and collagen IV.

PHARMACEUTICALS - Preferred components:

*(1) ursolic acid;
(2) oleanolic acid;
(3) palmitoyl pentapeptide having the peptide sequence -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser; and
(4) white lupin peptide extracts.
The amount of such materials present may comprise (%): ursolic acid (0.001 - 10), oleanolic acid (0.00025 - 2.5), palmitoyl pentapeptide (0.1 - 30 ppm), and lupin extract (0.2 - 10).*

Keyword Index Terms

[1] 232679-0-0-0-CL; 104465-0-0-0-CL;
97115-1-1-0-CL; 97115-1-1-0-ST; 160684-0-0-0-CL; 104479-0-0-0-CL; 339116-1-0-0-CL;
334725-0-0-0-CL; 109956-1-0-0-CL; 16469-1-0-0-CL

UP4

2002-05

UE4

2002-05; 2004-04

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 813 018

②① N° d'enregistrement national : **00 10773**

⑤① Int Cl⁷ : A 61 K 7/48

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②② Date de dépôt : 21.08.00.

③① Priorité :

⑦① Demandeur(s) : THE BOOTS CY PLC Public limited
company — GB.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 22.02.02 Bulletin 02/08.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

⑦② Inventeur(s) : LE SQUER SYLVIE, OGER PASCALE,
MARCANTUANI CHRISTELLE, BOBIER RIVAL
CARINE, FRUCTUS ALAIN et MATTA ANNE MARIE.

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : RINUY SANTARELLI.

⑤④ COMPOSITIONS COSMETIQUES RENFERMANT AU MOINS UN COMPOSE STIMULANT LA NEOSYNTHESE
DES LAMININES, ET/OU DE L'INTEGRINE ALPHA-2 BETA-1 ET/OU DU COLLAGENE IV DE LA JONCTION
DERMO- EPIDERMIQUE.

⑤⑦ Une composition cosmétique renfermant au moins un
composé stimulant la néosynthèse d'au moins un élément
important de la jonction dermo-épidermique tel que les lami-
nines, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et le collagène IV et renfermant no-
tamment de l'acide ursolique, de l'acide oléanolique, du
palmitoyl pentapeptide dans lequel le pentapeptide a la
séquence: -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser ou un extrait peptidique de
Lupin blanc.

FR 2 813 018 - A1



5 La présente invention concerne de nouvelles compositions cosmétiques renfermant au moins un composé stimulant la néosynthèse des laminines, et/ou de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et/ou du collagène IV de la jonction dermo-épidermique.

La peau humaine est constituée de trois tissus superposés :
10 l'hypoderme (le plus profond), le derme et enfin l'épiderme (le plus externe).

Pour assurer son rôle de première protection contre les agressions (mécaniques, chimiques, microbiologiques), l'épiderme a une structure hautement différenciée : depuis la couche basale, les cellules appelées kératinocytes subissent un processus métabolique de kératinisation qui les fait
15 se transformer au fur et à mesure qu'elles migrent vers les couches supérieures pour finalement devenir des cornéocytes extrêmement résistants et peu perméables, formant avec les lipides épidermiques sécrétés par les kératinocytes de la couche granuleuse, le Stratum Corneum, la couche la plus externe de l'épiderme, en contact avec le milieu extérieur.

20 Par ailleurs l'épiderme contient d'autres types cellulaires ayant des fonctions importantes et à forte capacité de communication : mélanocytes, cellules de Langherans, cellules de Merckel.

Ce processus de forte différenciation et ces nombreuses communications intercellulaires nécessitent de nombreux éléments nutritifs. Or
25 l'épiderme n'est pas irrigué par des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Ces éléments nutritifs doivent donc lui parvenir depuis le derme qui, lui, est irrigué. Il faut donc une diffusion correcte de ces éléments à travers la Jonction Dermo-Epidermique (JDE) qui fait le lien entre ces deux tissus.

Cette Jonction Dermo-Epidermique, doit en outre gérer la diffusion
30 de messagers biochimiques entre les deux tissus. Il a été montré que de nombreuses substances émises par chacun de ces tissus interfèrent sur l'activité de l'autre (travaux du Pr.R.E.Burgeson, Smola H., Exp.Cell.Res. 1998 Mar 15 ;239(2) :399-410)

Enfin la JDE doit assurer le contact entre ces deux tissus qui sont de
35 nature très différente.

Le derme est un tissu constitué d'une substance fondamentale dans laquelle baignent peu de cellules (les fibroblastes) et de très nombreuses fibres (collagènes et élastine), ce qui donne au derme une structure amorphe et compacte, cependant capable de s'étirer sous une contrainte mécanique puis
5 de revenir à sa dimension initiale quand la contrainte est relâchée.

L'épiderme est de type stratifié à forte densité de cellules jointives et empilées.

La JDE doit donc être capable d'assurer la cohésion entre ces deux tissus aux propriétés mécaniques peu compatibles quand la peau est
10 mécaniquement déformée. Pour assurer cette fonction, la JDE a une forme en vagues fortement marquées.

Toutes ces raisons font que la JDE a un rôle très important d'un point de vue métabolique et mécanique pour la bonne santé de la peau.

Or il est établi que, au cours du processus du vieillissement, la
15 qualité de la JDE tend à diminuer : elle s'aplatit et assure beaucoup moins bien son rôle de « ressort » (B.Le Varlet et Al. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 3:172-179,1998).

Le rôle important de la JDE est également attesté par la possibilité de maladies métaboliques quand un des éléments de la JDE est absent ou de
20 mauvaise qualité. On peut citer le cas de la pemphigoïde bulleuse dans laquelle l'absence d'un élément important (laminine-5) entraîne la formation de bulles : l'épiderme se détache du derme et forme des bulles qui évoluent en plaies difficiles à cicatriser.

La structure de la JDE est de mieux en mieux connue : on distingue
25 quatre couches qui ont chacune des composants spécifiques et un rôle bien précis (Allen J., Br.J.Dermatol. 1997 Dec ;137(6) :907-15),(M.Aumailley, Kidney Internat.,Vol 47, Suppl.49(1995),pp S-4-S-7).

On peut citer dans ces éléments importants des laminines, des intégrines et surtout des collagènes parmi lesquels principalement le collagène
30 IV.

Pour lutter contre le relâchement, la perte de souplesse et de tonicité, l'aspect terne et/ou flétri de la peau, des produits cosmétiques se sont attachés à revitaliser les éléments du derme et/ou de l'épiderme.

Une tendance nouvelle consiste à stimuler la synthèse des éléments importants de la JDE.

C'est en sélectionnant par deux tests spécifiques (décrits ci-après dans la partie expérimentale), des ingrédients actifs pour cette fonction, que la demanderesse a découvert que l'acide ursolique et l'acide oléanolique, non décrits dans la littérature pour ce type de propriétés, sont en fait capables de stimuler la néosynthèse de collagène IV; et que, de plus, l'association à un palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser spécifique pour cette activité, augmentait leur pouvoir stimulant d'une façon synergique inattendue.

Par ailleurs ce palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser est capable de stimuler la synthèse de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et de laminine.

Enfin, la demanderesse a découvert qu'un autre principe actif, un extrait peptidique de lupin blanc, connu pour ses propriétés anti-élastases et anti-collagénases (anti-métallo protéinases) est également capable de stimuler significativement la synthèse du collagène IV.

Ces principes actifs seuls ou associés sont donc parfaitement aptes à stimuler toute une série de fonctions de la peau, en particulier la néosynthèse d'éléments importants de la JDE, comme les laminines, l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et de façon synergique le collagène IV.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet une composition cosmétique renfermant au moins un composé stimulant la néosynthèse d'au moins un et de préférence deux, particulièrement trois éléments importants de la jonction dermo-épidermique et plus particulièrement des laminines, et/ou de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et/ou du collagène IV.

Parmi les composés stimulant la néosynthèse d'éléments importants de la jonction dermo-épidermique, on peut citer de préférence l'acide ursolique, l'acide oléanolique, le palmitoyl pentapeptide dans lequel le pentapeptide a la formule : -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser et les extraits peptidiques de Lupin blanc.

L'acide ursolique est un triterpène pentacyclique : l'acide 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oïque. On le trouve dans un grand nombre de plantes notamment le romarin. Il est généralement associé dans ces plantes, et dans les extraits commercialement disponibles, à son isomère l'acide oléanolique (acide 3-hydroxyoléan-12-en-oïque). Ces 2 produits ont beaucoup de propriétés

biologiques communes comme décrit par Jie Liu dans le « Journal of Ethnopharmacology 49 (1995) 57-68 » : effets hépatoprotecteurs, anti-inflammatoires, anti-tumoral, hypolipémiant, anti-athérosclérosant, anti-ulcéreux, antimicrobien, hypoglycémiant, protecteur contre la toxicité induite par la cyclophosphamide, anti-cariogène, et anti-fertilité. D'autres publications détaillent certaines propriétés comme l'inhibition de l'élastase leucocytaire humaine (Ying, Biochem. J. (1991) 277, 521-526), l'effet protecteur contre la lipoperoxydation lipidique (Balanehru, Biochemistry Internat. Vol 24, N°5, July 1991, 981-990), l'inhibition de la lipoxigénase et de la prolifération des cellules leucémiques HL60 (Simon, Biochimica et Biophysica Acta, 1125 (1992) 68-72), et enfin l'activité anti-virale (Serra, Pharmacological Research, Vol.29, N°4, 1994, 359-366).

Les mélanges d'acide ursolique/acide oléanolique se présentent généralement sous la forme de sel de sodium, les proportions respectives des deux variant de 80-20 à 70-30 suivant la plante dont sont extraits les dits mélanges, la pureté du mélange des deux pouvant aller de 60 à 98%. De ce fait les compositions selon l'invention pourront contenir l'un l'autre ou les deux acides.

L'extrait peptidique de lupin blanc (variété L. albus) contient des peptides purs de faible poids moléculaire, obtenus à partir de graines délipidées selon un procédé biotechnologique éliminant des polysaccharides. Ce procédé, qui comprend les étapes unitaires de solubilisation des protéines végétales, d'hydrolyse enzymatique et d'ultrafiltrations, permet d'obtenir des peptides comprenant 5 à 6 motifs d'acides aminés en moyenne. Ce type de produit est commercialisé notamment par la Société Expanchimie sous le nom commercial de « Actimp1.9.3[®] » et il est connu pour ses propriétés inhibitrices des matrices métallo protéinases (MMP). Le produit est une solution aqueuse qui contient environ 10% de matières sèches ; son pH est de 6,5 à 7,5.

Le palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser est mimétique d'un fragment de procollagène de type I. Il est obtenu par synthèse peptidique et ensuite lié à une chaîne palmitique pour lui conférer une meilleure lipophilie et donc une meilleure pénétration cutanée. Le palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser est commercialisé par la Société Sederma sous le nom commercial

Matrixyl®, inclus dans un gel à la dose de 100 ppm, le gel contenant 25% environ d'eau, 20% environ de butylène glycol, 1% environ de carbomer, et 0,5% environ de polysorbate 20. Le produit commercial se présente sous forme d'un gel opalescent blanchâtre, de pH 4 à 6, de densité à 20°C de 1,140 à 1,160, ayant un indice de réfraction à 25°C compris entre 1,425 et 1,445.

Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre de l'invention, une composition ci-dessus renferme de l'acide ursolique et/ou de l'acide oléanolique et en outre le palmitoyl pentapeptide dans lequel le pentapeptide a la formule : -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser.

10 Dans les compositions selon l'invention, l'acide ursolique pourra représenter par exemple de 0,001 % à 10 %, notamment de 0,01% à 5%, de préférence de 0,05 % à 2 % et tout particulièrement de 0,07 % à 1 % de la composition terminée.

L'acide oléanolique pourra représenter par exemple de 0,00025 % à 2,5 %, notamment de 0,0025 % à 1,3 %, de préférence de 0,0125 % à 0,5 % et tout particulièrement de 0,0175 % à 0,25 % de la composition terminée.

Le palmitoyl pentapeptide pourra représenter par exemple de 0,1 à 30 ppm, notamment de 0,5 à 20 ppm, de préférence de 1 à 15 ppm, et tout particulièrement de 2 à 10 ppm de la composition terminée.

20 L'extrait peptidique de Lupin blanc pourra représenter par exemple de 0,2 % à 10 %, notamment de 0,5 % à 5%, de préférence de 0,7 % à 4 % et tout particulièrement de 1 % à 3 % de la composition terminée.

On peut citer tout particulièrement les compositions contenant de 0,01% à 5% d'acide ursolique/acide oléanolique associé à 0,1 à 30 ppm de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser et celles contenant de 0,2% à 2% d'acide ursolique/acide oléanolique associé à 1 à 10 ppm de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser.

Des associations particulièrement préférées de principes actifs sont des associations dans la même composition

- 30
- d'acide ursolique et d'acide oléanolique,
 - d'acide ursolique et/ou d'acide oléanolique et de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser,

- d'acide ursolique et/ou d'acide oléanolique et d'extrait peptidique de Lupin blanc,

- d'acide ursolique et/ou d'acide oléanolique, de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser et d'extrait peptidique de Lupin blanc.

5 Les compositions selon l'invention sont essentiellement destinées à être appliquées sur la peau. Elles prendront avantageusement la forme de gels hydro-alcooliques ou hydro-glycoliques, d'émulsions eau/huile ou huile/eau, avec ou sans émulsionnants, avec ou sans phases lamellaires, d'émulsions triples eau/huile/eau ou huile/eau/huile, de micro émulsions, de mini-émulsions.

10 Les compositions objet de la présente invention possèdent de très intéressantes propriétés. Elles sont doués notamment de remarquables propriétés dans la lutte contre les effets du vieillissement cutané.

Ces propriétés sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale. Elles justifient l'utilisation des compositions ci-dessus décrites à titre de
15 compositions cosmétiques.

Les compositions selon la présente invention trouvent leur emploi par exemple dans la lutte tant curative que préventive contre les effets du vieillissement cutané.

Elles trouvent aussi leur emploi dans les soins du visage et du corps
20 pour lutter contre le relâchement cutané, dans les soins d'amincissement, tant pour les peaux sensibles que matures que grasses.

Les compositions selon la présente invention sont préparées selon les méthodes usuelles. Le ou les composés actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans les compositions cosmétiques destinées
25 à la voie topique, tels que la glycérine, le sorbitol, les stéarates, les PEG, les silicones, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les alcools ou acides gras, divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs, les parfums.

30 La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'une composition ci-dessus décrite, caractérisé en ce que l'on mélange, selon des méthodes connues en elles mêmes, le ou les principes actifs avec des excipients acceptables, notamment cosmétiquement acceptables. En général, on

préparera séparément une phase aqueuse et une phase grasse, puis on les mélangera à chaud sous agitation.

La présente demande a encore pour objet l'utilisation d'un composé stimulant la néosynthèse d'au moins un et de préférence deux, particulièrement
5 trois éléments importants de la jonction dermo-épidermique et plus particulièrement des laminines, et/ou de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et/ou du collagène IV pour le traitement de la peau et notamment dans la lutte tant curative que préventive contre les effets du vieillissement cutané, ainsi qu'un procédé de
10 lutte tant curative que préventive contre les effets du vieillissement cutané dans lequel on applique par voie topique une quantité efficace d'une composition telle que décrite ci-dessus.

Les conditions préférentielles de mise en oeuvre des compositions ci-dessus décrites s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus.

15

Les exemples qui suivent illustrent la présente invention.

Exemple 1. : Crème anti-rides

20 On a préparé une crème anti-rides pour les peaux normales et les peaux mixtes comme suit :

On prépare la phase grasse suivante :

Alcool cétylique et stéarate de glycéryle et stéarate de PEG-7S	
et ceteth-20 et stéareth-20	
	4g
25 Huile de jojoba	3g
Triglycérides capryliques/capriques	3g
Esters de jojoba	1g
Polyisobutène hydrogéné	2g
Cyclométhicone	5g

30 Ce mélange est porté à 70°C et bien homogénéisé.

Par ailleurs, on prépare la phase aqueuse suivante :

Eau purifiée quantité suffisante pour (QSP)	100g
EDTA tétrasodique	0,05g
Sorbitol	2g

Cellulose	1g
Billes de silice enrobées d'oxyde de titane et d'oxyde de fer	1g
Copolymère sodium acryloyldiméthyltaurate et isohexadecane et Polysorbate 80	2g

- 5 Tous les ingrédients de la phase aqueuse sont dissous dans l'eau et l'ensemble est porté à 70°C.

La phase grasse, homogène et chauffée à 70°C, est versée lentement sur la phase aqueuse portée à la même température, sous agitation assez vive. L'agitation est maintenue pendant 10 minutes après la fin de l'introduction de la phase grasse. L'émulsion huile dans eau se forme.

- 10

Ensuite, l'émulsion est refroidie sous agitation modérée.

Quand la température atteint 40°C, on ajoute successivement sous agitation modérée:

	Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	3g
15	Extrait de Lupin blanc	1g
	Acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium	
	Polyéthylène glycol 400 (PEG400) (10/90)	2g
	Hyaluronate de sodium	0,5g
	Conservateurs	0,15g
20	Parfum	0,35g

Après homogénéisation, l'émulsion est refroidie jusqu'à 30°C sous agitation lente.

On obtient ainsi une émulsion de couleur rosée, de consistance agréable, adaptée pour les peaux normales et mixtes.

25

Exemple 2. : Emulsion cosmétique

On prépare la phase grasse suivante :

	Alcool cétylique et stéarate de glycéryle et stéarate de PEG-7S	
30	et ceteth-20 et stéareth-20	4g
	Huile de jojoba	4g
	Triglycérides capryliques/capriques	4g
	Esters de Jojoba	1g
	Polyisobutène hydrogéné	4g

	Stéarate d'isocétyle	4g
	Ricinoléate de cétyle	4g
	Beurre de karité	1g
	Huile de silicone (phényl triméthicone)	5g
5	Huile de silicone (diméthicone)	2g
	Dipentaérythrityl hexacaprylate/hexacaprate	3g

Ce mélange est porté à 70°C et bien homogénéisé.

Par ailleurs, on prépare la phase aqueuse suivante :

	Eau purifiée quantité suffisante pour (QSP)	100g
10	EDTA tétrasodique	0,05g
	Sorbitol	3g
	Glycérine	4g
	Polyméthacrylate de glycéryle /propylène glycol	5g
	Cellulose	2g
15	Billes de silice enrobées d'oxyde de titane et d'oxyde de fer	1g
	Copolymère acryloyldiméthyltaurate de sodium et isohexadécane et polysorbate 80	1,25g

Tous les ingrédients de la phase aqueuse sont dissous dans l'eau et l'ensemble est porté à 70°C.

- 20 La phase grasse, homogène et chauffée à 70°C, est versée lentement sur la phase aqueuse portée à la même température, sous agitation assez vive. L'agitation est maintenue pendant 10 minutes après la fin de l'introduction de la phase grasse. L'émulsion huile dans eau se forme.

Ensuite, l'émulsion est refroidie sous agitation modérée.

- 25 Quand la température atteint 40°C, on ajoute successivement sous agitation modérée:

	Gel de palmitoyl pentapeptide - Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	3g
	Extrait de lupin blanc	1g
30	Acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium	
	Polyéthylène glycol 400 (10/90)	2g
	Hyaluronate de sodium	0,1g
	Conservateurs	0,15g

Parfum

0,45g

Après homogénéisation, l'émulsion est refroidie jusqu'à 30°C sous agitation lente.

On obtient ainsi une émulsion de couleur rosée, de consistance
5 agréable, adaptée pour les peaux sèches et très sèches.

Exemple 3. : Crème de type huile/eau

On prépare la crème de type huile/eau suivante :

10 La phase grasse est constituée de :

	Diméthicone copolyol et triglycérides capryliques/capriques	3g
	Néopentanoate d'isodécyle	5g
	Polyisobutène hydrogéné	5g
	triglycérides capryliques/capriques	5g
15	Huile de jojoba	5g
	Alcool cétylique	1g
	Acide stéarique	1g
	Cire d'abeilles	1g
	Stéarate de glycérol	0,5g
20	Huile de silicone (Diméthicone)	2g

Cette phase grasse est chauffée à 70°C et bien homogénéisée.

Par ailleurs on prépare la phase aqueuse suivante :

	Eau purifiée quantité suffisante pour (QSP)	100g
	EDTA tétrasodique	0,05g
25	Glycérine	3g
	Sorbitol	2g
	Carbomer	0,25g
	Gomme xanthane	0,2g
	Biosaccharide Gum-1	5g
30	Polyéthylène glycol 400	2g
	Méthyle paraben	0,25g
	Propyle paraben	0,15g
	Soude à 10%	0,5g

Tous les ingrédients de la phase aqueuse sont dissous dans l'eau et l'ensemble est porté à 70°C.

La phase grasse, homogène et chauffée à 70°C, est versée lentement sur la phase aqueuse portée à la même température, sous agitation assez vive. L'agitation est maintenue pendant 10 minutes après la fin de l'introduction de la phase grasse. L'émulsion huile dans eau se forme.

Ensuite, l'émulsion est refroidie sous agitation modérée.

Quand la température atteint 40°C, on ajoute successivement sous agitation modérée:

10	Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	10g
	Extrait de lupin blanc	0,5g
	Acide ursolique/acide oléanolique, éthoxydiglycol (10/90)	0,2g
	Parfum	0,35g

Après homogénéisation, l'émulsion est refroidie jusqu'à 30°C sous agitation lente.

On obtient une crème blanche onctueuse, au toucher très frais.

Exemple 4. : Composition cosmétique

On a préparé la crème eau/huile suivante :

La phase grasse est constituée de :

	Copolyol cétyl diméthicone	3g
	Néopentanoate d'isodécyle	5g
	Polyisobutène hydrogéné	1,5g
25	Triglycérides capryliques/capriques	1,5g
	Huile de jojoba	1,5g
	Béhénate de diméthiconol	1,5g
	Copolymère de cyclométhicone et diméthicone	10g

Cette phase grasse est chauffée à 60°C et bien homogénéisée.

Par ailleurs on prépare la phase aqueuse suivante :

	Eau purifiée quantité suffisante pour (QSP)	100g
	Chlorure de sodium	0,5g
	Glycérine	2g

Sorbitol	2g
Polyéthylène Glycol 400	2g
Méthyle paraben	0,25g
Propyle paraben	0,15g

- 5 Tous les ingrédients de la phase aqueuse sont dissous dans l'eau et l'ensemble est porté à 60°C.

La phase grasse, homogène et chauffée à 60°C, est versée lentement sur la phase aqueuse portée à la même température, sous agitation assez vive. L'agitation est maintenue pendant 10 minutes après la fin de l'introduction de la phase grasse. L'émulsion eau dans huile se forme.

Ensuite, l'émulsion est refroidie sous agitation modérée.

Quand la température atteint 40°C, on ajoute successivement sous agitation modérée:

Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	1g
15 Extrait de lupin blanc	2g
Acide ursolique/acide oléanolique, éthoxydiglycol (10/90)	10%
Parfum :	0,35%

Après homogénéisation, l'émulsion est refroidie jusqu'à 30°C sous agitation lente.

- 20 On obtient une crème blanche très onctueuse, pouvant être appliquée la nuit.

Exemple 5. : Crème huile/eau à phases lamellaires

- 25 On a préparé la crème huile/eau à phases lamellaires suivante :

La phase grasse est constituée de :

Alcool cétéarylique et Glucoside cétéarylique	6 g
Stéarate d'octyle	2g
Cire d'abeilles	1,5g
30 Propylène glycol dicaprylate/dicaprate	2,5g
Huile de jojoba	4g
Beurre de karité	4g
Huile de silicone (Diméthicone)	2g

Cette phase grasse est chauffée à 80°C et bien homogénéisée.

Par ailleurs on prépare la phase aqueuse suivante :

	Eau purifiée quantité suffisante pour (QSP)	100g
	EDTA tétrasodique	0,05g
5	Polyméthacrylate de glycéryle et propylène glycol	10g
	Polyéthylène glycol 400	2g
	Méthyl paraben	0,25g
	Propyl paraben	0,15g
	O-Cymen-5-ol	0,1g

- 10 Tous les ingrédients de la phase aqueuse sont dissous dans l'eau et l'ensemble est porté à 80°C.

- La phase grasse, homogène et chauffée à 80°C, est versée lentement sur la phase aqueuse portée à la même température, sous agitation assez vive. L'agitation est maintenue pendant 10 minutes après la fin de l'introduction de la phase grasse. L'émulsion huile dans eau se forme.
- 15

Ensuite, l'émulsion est refroidie sous agitation modérée.

Quand la température atteint 40°C, on ajoute successivement sous agitation modérée:

	Gel de palmitoyl pentapeptide-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	5g
20	Extrait de lupin blanc	5g
	Acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium/	
	Polyéthylène glycol 400 (20/80)	10%
	Parfum	0,35%

- Après homogénéisation, l'émulsion est refroidie jusqu'à 30°C sous agitation lente.
- 25

On obtient une crème blanche très onctueuse, à phases lamellaires, qui peuvent faciliter la pénétration des principes actifs et en prolonger l'hydratation.

- 30 Etude pharmacologique
- Cytotoxicité

L'ensemble de ces produits et mélanges ci-après se sont avérés ne pas être cytotoxiques aux concentrations utiles, dans les conditions décrites dans l'expérimentation 1 .

- 5 Expérimentation 1 : Effet des produits testés sur la production de collagène IV, de laminine et d'intégrine $\alpha 2\beta 1$ par des fibroblastes humains (méthode immuno enzymatique de type immunoempreinte)

On a testé les produits et mélanges suivants :

- 10 - P1 : Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser à 1 ou 2%
 - P2 : Extrait de Malt à 1 ou 2%
 - P3 : Extrait de Levure 2 ou 3%
 - P4 : Acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium à 0,0037 ou 0,0075%
 - M1 : Mélanges P1(2%) +P2(2%) ou P1(1%) +P2(1%)
15 - M2 : Mélanges P1(2%)+ P3 (3%) ou P1(1%)+P3(2%)
 - M3 : Mélanges P1(2%)+ P4(0,0075%) ou P1(1%)+ P4(0,0037%)
 - M4 : Mélanges P2(2%)+ P3(3%) ou P2(1%)+ P3(2%)
 - M5 : Mélanges P2(2%)+ P4(0,0075%) ou P2(1%)+ P4(0,0037%)
 - M6 : Mélanges P3(3%)+ P4(0,0075%) ou P3(2%)+ P4(0,0037%)
20 - TGF β (transforming growth factor β) humain (TGF β , Sigma T7039) 10 ng/ml (final)
 - Acide rétinoïque (AR, « all-trans retinoic acid », Sigma R2625) 10^{-8} M, connu pour son effet antvieillessement.

- 25 On procède comme suit :

On ensemence des fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF, R8PF2, utilisés au 8e passage) dans un milieu MEM/M199 (Gibco) sans sérum. On les cultive jusqu'à confluence à 37°C et sous 5% de CO₂. Puis on traite en triplicata respectivement avec les 12 préparations ou mélanges en
30 continu pendant 72H .

Les tapis cellulaires sont observés à la fin des traitements et les échantillons sont congelés à -80 °C. A la fin des traitements, les milieux de culture sont complétés par du dodécyl sulfate de sodium (SDS) (1 % final),

les protéines cellulaires et extracellulaires sont extraites pendant 30 min sous agitation; l'extraction est complétée par une sonication douce de tous les échantillons.

On procède alors à une immunoempreinte : Les fractions protéiques
5 sont transférées sur nitrocellulose (Hybond, ECL, Amersham), à l'aide d'un module MilliBlot (Millipore, transfert sous vide). Deux nitrocelluloses sont utilisées pour chaque anticorps utilisé (8 membranes en tout; 45 spots par membrane). Pour chaque série, des puits contrôles (sans cellule) avec du milieu de culture contenant les produits à l'essai à la plus forte concentration
10 sont réalisés (ceci afin de détecter une éventuelle reconnaissance du produit à l'essai par l'un ou l'autre des anticorps). D'autre part, des contrôles sans anticorps primaires ont été réalisés (cellules non traitées).

Les membranes ont été saturées par incubation 16 heures (4 °C) dans un tampon phosphate PBS/0,05 % Tween 20/5 % lait écrémé (PBSTL).
15 Les bandes de puits contrôles sans anticorps primaire ont été découpées pour traitement à part (incubation avec le conjugué-peroxydase seulement). Après lavages, les sites antigéniques spécifiques ont été marqués par les anticorps primaires (voir tableau ci-dessous) aux dilutions indiquées (dans du PBSTL, voir tableau ci-dessous), pendant 1 h, à 37 °C. Les anticorps primaires fixés ont
20 été révélés par un conjugué anti-immunoglobulines-peroxydase. Après lavages extensifs en PBS/0,05 % Tween 20 (PBST), l'activité peroxydase a été révélée par la méthode ECL (Enhanced ChimiLuminescence, Amersham), sur film Kodak MP. La saisie des images a été réalisée sur GelPrint 2000i (BioPhotonics Corp.); les analyses densitométriques ont été obtenues à l'aide
25 du logiciel One-D-Scan (Scanalytics).

Le paramètre d'évaluation est l'hydrolyse MTT.

Les différents anticorps utilisés sont les suivants :

marqueur	anticorps primaire	référence	dilution
β -actine	monoclonal	Sigma A4700	1/500e
intégrine $\alpha 2\beta 1$	mélange polyclonal anti- $\alpha 2$ + polyclonal anti- $\beta 1$	Chemicon AB1944 Chemicon AB1952	1/500e 1/500e
laminine	polyclonal	Chemicon AB19012	1/500e
collagène IV	polyclonal	Rockland 600-401-106-0.1	1/1000e

marqueur	anticorps secondaire	référence
β -actine	RAM-peroxydase (Blot) ou GAM-FITC (immunofluo.)	Sigma A9044 Tebu M30801
intégrine $\alpha 2\beta 1$	GAR-peroxydase (Blot) ou GAR -FITC (immunofluo.)	Sigma A9169 Tebu L42001
laminine	GAR-peroxydase (Blot) ou GAR -FITC (immunofluo.)	Sigma A9169 Tebu L42001
collagène IV	GAR -peroxydase (Blot) ou GAR -FITC (immunofluo.)	Sigma A9169 Tebu L42001

Les données brutes sont transférées et traitées sous le logiciel PRISM® (Graph Pad Software). Les comparaisons intergroupes ont été réalisées par analyse de variance (ANOVA), à l'aide du test de comparaison multiple de DUNNETT.

Immunofluorescence

Les contrôles en immunofluorescence ont été réalisés sur des tapis cellulaires non traités (témoins), fixés au méthanol à -20 °C et séchés. Le principe, les réactifs et les temps ont été les mêmes que pour l'immunoempreinte. Les anticorps secondaires étaient des conjugués – N-isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (voir tableau ci-dessus) au lieu de conjugués peroxydase. Les noyaux cellulaires ont été colorés par incubation dans une solution de colorant de Hoechst 1 μ g/ml (bis-benzimide, Sigma B1155).

Les coupes ont été observées au microscope en épifluorescence (NIKON, Diaphot 300).

Les saisies d'images ont été réalisées à l'aide d'une caméra COHU pilotée par un logiciel Visiolab 200.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- 5 Globalement, l'acide rétinoïque (10^{-8} M) et le TGF β (10 ng/ml) n'ont pas (ou peu) stimulé la production des marqueurs sélectionnés, alors qu'une efficacité relative du TGF β vis à vis de la production de collagène IV et de laminine pouvait être attendue.

Effet sur l'actine

- 10 L'actine a été prise comme marqueur de référence pour montrer que le modèle de cellules utilisé était valide. Une relative fluctuation des résultats a été observée avec l'anticorps monoclonal anti-actine. En règle générale, aucun des produits ou mélanges n'a montré de stimulation notable de l'expression d'actine (pas de prolifération cellulaire accrue de façon significative;
15 l'expérience a été réalisée à confluence). D'autre part, les produits et mélanges n'ont pas réduit de façon significative la production d'actine, bien que l'Extrait de Malt (2 % et 1 %) et l'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium (0,0075 %) aient eu apparemment tendance à diminuer le signal mesuré.

- 20 A noter une interférence avec l'extrait de levure : le produit seul (sans cellule) produit un signal visible suggérant qu'une composante du produit est reconnue par l'anticorps monoclonal anti-actine.

Effet sur l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$

- 25 Le gel de palmitoyl pentapeptide-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser testé seul aux deux concentrations sélectionnées a conduit à une augmentation du signal intégrine $\alpha 2 \beta 1$.

Les autres produits testés n'ont pas montré d'augmentation significative (reproductible) d'intégrine $\alpha 2 \beta 1$.

- 30 A noter un très fort signal obtenu avec l'extrait de levure; ce produit contient des composants ayant des épitopes reconnus par l'un ou l'autre des anticorps anti-intégrine du mélange utilisé. Il semble donc hautement probable que ce produit contienne des composants protéiques d'origine cellulaire, et cela

en quantité non négligeable. L'activité de ce produit sur la production d'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ne peut donc être mesurée en utilisant les conditions expérimentales de cet essai.

Les mélanges contenant l'extrait de malt, l'extrait de levure et l'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium n'ont pas montré d'activité significative.

Effet sur la laminine

Le gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser testé seul à 2 % et 1 % a stimulé de façon significative la production de laminine par les NHDF.

L'extrait de malt, l'extrait de levure et l'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium n'ont pas montré de stimulation significative dans ces conditions expérimentales.

Les mélanges ont montré des activités variables.

Effet sur le collagène IV

Les mesures de production relative de collagène IV ont montré des résultats homogènes.

Le gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser a fortement stimulé la production de collagène IV ; d'autre part, tous les mélanges contenant le gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser ont stimulé d'un facteur supérieur à 2 fois la production de collagène IV.

L'extrait de malt et l'extrait de levure n'ont pas montré de stimulation significative. A noter que, comme pour la laminine, l'extrait de levure n'est pas reconnu par l'anti-collagène IV (pas de signal significatif dans le contrôle de l'extrait de levure sans cellules).

L'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium à 0,0075 % a montré une intensification significative du signal (facteur 1,5) ; une stimulation plus faible (non significative) a été observée à 0,0037 %. Les mélanges contenant l'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium à 0,0075 % ont une activité du même ordre que le produit seul.

Les résultats obtenus avec les produits isolés sont reportés dans le tableau ci-dessous (analyse densitométrique, résultats en % par rapport au témoin non traité).

Traitements	Intégrine $\alpha 2\beta 1$	Laminine	Collagène IV	β Actine
P1 à 2% (P11)	+ 104%	+ 55%	+ 160%	- 12%
P1 à 1% (P12)	+ 125%	+ 27%	+ 122%	- 13%
P2 à 2% (P21)	+ 20%	- 4%	- 6%	- 28%
P2 à 1% (P22)	- 10%	- 3%	- 6%	- 30%
P3 à 3% (P31)	+ 516%	- 10%	+ 21%	-10%
P3 à 2% (P32)	+ 429%	- 20%	+ 9%	- 5%
P4 à 0,0075% (P41)	+ 44%	- 23%	+ 59%	-25%
P4 à 0,0037% (P42)	+ 31%	- 21%	+ 24%	-19%
TGF β	+ 4%	0 %	- 19%	-14%
Acide rétinoïque	- 3%	- 18%	- 13%	-8%
Témoin	0 %	0%	0%	0%

5

Les résultats obtenus avec les mélanges sont reportés dans le tableau ci-dessous.

	Intégrine $\alpha 2\beta 1$	Laminine	Collagène IV	β Actine
M11 (P11/P21)	+ 13%	+ 14%	+ 198%	-12%
M12 (P12/P22)	+ 3%	+ 20%	+ 147%	-14%
M21 (P11/P31)	+ 528%	+ 5%	+ 152%	-7%
M22 (P12/P32)	+ 481%	+ 16%	+ 139%	+2%
M31 (P11/P41)	- 3%	+ 7%	+ 102%	-46%
M32 (P12/P42)	+ 35%	+ 35%	+ 124%	-28%
M41 (P21/31)	+ 620%	+ 11%	+ 2%	-12%
M42 (P22/32)	+ 662%	+ 24%	- 15%	+1%
M51 (P21/P41)	- 18%	- 19%	+ 51%	-36%
M52 (P22/42)	- 31%	- 7%	- 26%	-34%
M61 (P31/P41)	+ 420 %	+ 14%	+ 59%	+8%
M62 (P32/42)	+ 382%	+ 30%	+ 31%	+11%
TGF β	- 30%	+ 14%	- 39%	-20%
Acide rétinoïque	- 28%	- 12%	- 41%	-16%
Témoin	0 %	0 %	0 %	0%

Conclusions :

Le gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser (P1) stimule la production des trois marqueurs de la jonction dermo-épidermique sélectionnés.

5 L'activité du produit est particulièrement nette sur le collagène IV.

L'extrait de malt (P2), seul ou en mélange n'a pas montré d'activité particulière.

10 L'Extrait de levure (P3) a produit des artefacts avec l'anticorps anti-actine et surtout avec l'anticorps anti-intégrine. Le produit seul ou en mélange n'a pas montré d'activité particulière en ce qui concerne la laminine et le collagène IV.

15 L'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium (P4) a stimulé la production de collagène IV. L'effet observé est moins net qu'avec le gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser ; cet effet est cependant apparemment reproductible (reproduit avec les mélanges contenant acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium).

Expérimentation 2 : Evaluation de l'activation de la néosynthèse de collagène IV dans le modèle d'épiderme reconstruit SkinEthic®.

5 On a testé les produits suivants

- Placebo : PEG400/eau purifiée(10/90) ; appelée Po
- Formulation 1 : Acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium à 0,1%, appelé F1
- Formulation2 : Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser à 3%,
10 appelé F2
- Formulation 3 : mélange d'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium à 0,1% et de Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser à 3%, appelé F3
- Formulation 4 : Extrait de lupin blanc à 1%, appelé F4,

15 (F1, F2, F3, et F4 sont utilisés en solution aqueuse dans 10 % final de PEG 400), comme suit :

On utilise des épidermes reconstruits de type Skinethic de 13 jours (4 cm²), cultivés dans du milieu Skinethic. On vérifie l'expression des messagers intégrine $\alpha 2$, $\beta 1$ et collagène IV dans les épidermes reconstruits par
20 méthode RT-polymerase chain reaction (RT-PCR).

20 épidermes ont été traités par les formulations ou le placebo, en application topique, à raison de 5 mg/cm² par épiderme (20 μ l). Quatre épidermes ont été traités avec 20 μ l pour chaque produit ; pour chaque traitement, deux épidermes ont été cultivés pendant 18 h et extraits pour
25 analyse ; les deux autres épidermes de chaque lot ont été à nouveau traités et re-cultivés pendant 48 h supplémentaires avant extraction (72 h de traitement en tout).

On analyse alors les ARN par northern blot et les protéines par southern blot.

30

Analyse des ARN par northern blot

On a préparé les sondes ADN ci-après à partir des fragments d'ADNc réalisés lors des étapes préliminaires, après réamplification et purification.

Marqueur	Amorceur	Taille de l'ADNc
β -actine	(+) 5'-CTACGTGCGCCCTGGACTTCGAGC-3' (-) 5'-GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'	385
intégrine $\alpha 2$	(+) 5'-GACCATTGTCCAGAAGACATCTCATGGC-3' (-) 5'-TACCAAGAGCACGTCTGTAATGGTGTCT-3'	366
intégrine $\beta 1$	(+) 5'-CAAGGTAGAAAGTCGGGACAAATTACCC-3' (-) 5'-GGATTGACCACAGTTGTTACGGCACTCT-3'	231
collagène IV	(+) 5'-GTACTGCAACCCTGGTGATGTCTGC-3' (-) 5'-GAATATCCGATCCACAACTCCGCC-3'	231

- 5 Schématiquement, on a procédé à l'amplification du brin antisens de chaque ADNc en utilisant le mélange réactionnel suivant (25 μ l; concentrations finales): 25 U/ml RedTaq (Sigma D4309); 2.5 μ l tampon RedTaq 10x; 20 μ M dTTP; 20 μ M dCTP; 20 μ M dGTP; 2 μ M [α - 32 P]-dATP (15 μ l, 150 μ Ci, 3000 Ci/mmol, Amersham PB10204); 1 ng/ μ l ADNc purifié; 1 μ M Amorceur antisens
- 10 (-). Conditions de PCR: 94 °C 2 min; puis 30 fois la séquence (95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min), puis 1 cycle d'élongation de 7 min, à 72°C puis procédé à la purification des 3 sondes sur 3 colonnes Chroma Spin-200 (Clontech S0269), selon les directives du fournisseur; suivie de la purification par comptage en scintillation liquide ; rassemblement des fractions relatives à
- 15 chaque sonde.

Extraction d'ARN total, électrophorèses et transfert

- A la fin du traitement, les épidermes ont été dissociés de leur nacelle et congelés immédiatement (-80 °C) dans 1,25 ml de Tri-Reagent (TR, Sigma
- 20 T9424), en tube Eppendorf sans RNase.

Le northern blot a été réalisé comme suit

- décongélation des échantillons, broyage extensif et élimination des particules solides (membrane-support...)
 - extraction de l'ARN total de chaque épiderme selon la
- 25 méthodologie préconisée par le fournisseur de Tri-Reagent (Sigma) ; la fraction renfermant les protéines a été gardée pour analyse à part.

- solubilisation de l'ARN extrait dans 50 µl d'eau sans RNase (eau-DiEthylPyroCarbonate (DEPC) (Maniatis *et al.*, 2nd éd.).

- vérification de la qualité et de l'homogénéité des échantillons d'ARN après séparation d'un aliquote (2 µl) par électrophorèse en gel d'agarose/formaldéhyde en présence de bromure d'éthidium (Maniatis *et al.*, 2nd éd.). Observation sous UV et saisie des images sur GelPrint 2000i (BioPhotonics Corp.) ;

- quantification de l'ARN par mesure de l'absorption à 260 nm ; ajustement des solutions d'ARN à 1 µg/µl ;

10 - séparation de chacun des échantillons d'ARN sur 4 gels d'agarose/formaldéhyde (2 µg d'ARN/puits pour l'actine et les intégrines; 5 µg/puits pour le collagène IV)

- transfert par capillarité (Maniatis *et al.*) sur membranes de nylon Hybond-N (Amersham RPN1510N), 16 heures (une membrane par sonde) ;

15 couplage covalent des ARN au nylon par chauffage des membranes sèches 90 min, à 80 °C.

Hybridations et analyses

20 - préhybridation des membranes individuelles dans 8 ml d'ExpressHyb (Clontech S1135)/0,1 mg/ml « salmon testes DNA, Sigma D7656 » dénaturé ; préhybridation à 68 °C, 20 min (3 bouteilles à hybridation ; four Stuart) ;

- hybridation 16 heures à 68 °C, après addition de sonde marquée ;

25 - 4 lavages en 2x saline sodium citrate (SSC) (Maniatis *et al.*)/1 % SDS, à 68 °C, pendant 30 min; 1 lavage en 0,1x SSC/0,5 % SDS, à 68 °C; 1 lavage en 2x SSC ;

- autoradiographie des membranes enveloppées dans du « Saran wrap », à - 80 °C, sur film Kodak Biomax MS. Saisie des images ;

30 - comptage direct de la radioactivité des spots à l'aide d'un InstantImager (Packard Instruments).

Analyse des protéines southern blot

Les protéines ont été repurifiées à partir des interfaces eau/solvant issues du protocole de purification des ARN. La fraction protéique totale a été

préparée comme spécifié dans le protocole d'utilisation du Tri-reagent. Les protéines ont été finalement dissociées en tampon de dépôt d'électrophorèse SDS (SDS-PAGE) ; les concentrations finales de SDS et de 2-mercaptoéthanol étaient de 2 %.

- 5 Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (gels d'acrylamide 8 %) et transférées (transfert électrique en milieu liquide) sur nitrocellulose (Hybond, ECL, Amersham). Dans chaque série, des contrôles sans anticorps primaires ont été réalisés. Les membranes ont été saturées par incubation 16 heures (4 °C) dans un tampon PBS/0,05 % Tween 20/5 % lait écrémé (PBSTL).
- 10 Les bandes de puits contrôles sans anticorps primaire ont été découpées pour traitement à part (incubation avec le conjugué peroxydase seulement). Après lavages, les sites antigéniques spécifiques ont été marqués par les anticorps primaires aux dilutions indiquées dans du PBSTL (voir tableau ci-dessous), pendant 1 h, à 37 °C. Les anticorps primaires fixés ont été révélés par un
- 15 conjugué anti-immunoglobulines - peroxydase. Après lavages extensifs en PBST, l'activité peroxydase a été révélée par la méthode ECL (enhanced chimiluminescence, Amersham), sur film Kodak MP. La saisie des images a été réalisée sur GelPrint 2000i (BioPhotonics Corp.); les analyses densitométriques ont été obtenues à l'aide du logiciel One-D-Scan (Scanalytics).

20

Le tableau ci-dessous liste les différents anticorps utilisés.

marqueur	anticorps primaire	référence	dilution
β -actine	monoclonal	Sigma A4700	1/500e
intégrine $\alpha 2 \beta 1$	mélange polyclonal anti- $\alpha 2$ + polyclonal anti- $\beta 1$	Chemicon AB1944 Chemicon AB1952	1/500e 1/500e
collagène IV	polyclonal	Rockland 600-401-106-0.1	1/1000e

marqueur	anticorps secondaire	référence
β -actine	RAM-peroxydase (Blot) ou GAM-FITC (immunofluo.)	Sigma A9044 Tebu M30801
intégrine $\alpha 2\beta 1$	GAR-peroxydase (Blot) ou GAR -FITC (immunofluo.)	Sigma A9169 Tebu L42001
collagène IV	GAR -peroxydase (Blot) ou GAR -FITC (immunofluo.)	Sigma A9169 Tebu L42001

Les résultats obtenus sont les suivants :

Effets sur la transcription, northern blot

Les effets observés par PhosphorImager sont quantifiés en % versus

5 placebo.

Traitement	Intégrine $\alpha 2$	Intégrine $\beta 1$	Collagène IV
P0	0	0	0
F1	-17%	+16%	+21%
F2	-34%	-2%	-6%
F3	-30%	-24%	-12%
F4	-16%	-39%	+20%
P0 à 72H	0	0	0
F1 à 72H	+17%	+12%	-53%
F2 à 72H	-37%	+12%	-41%
F3 à 72H	-58%	-18%	-80%
F4 à 72H	-8%	+6%	-30%

Actine (référence)

L'ARN de tous les échantillons a été quantifié ; la même quantité
10 d'ARN a été déposée pour tous les échantillons traités. Ainsi, dans la mesure
où le nombre de copies de messenger actine est considéré comme stable et
importante dans une cellule normale, la quantité de messagers actine doit être
stable en l'absence de modifications profondes du profil d'expression des gènes
cellulaires (hyperprolifération, cytotoxicité...). Mises à part quelques fluctuations
15 expérimentales, la quantité de messenger actine mesurée était relativement

stable après 18 h de traitement ; des fluctuations plus importantes ont été observées au temps 72 h.

La mesure de l'expression des différents marqueurs dans chaque échantillon a été rapportée à l'expression relative d'actine dans le même échantillon.

Intégrine $\alpha 2$

Les traitements n'ont pas montré d'effet stimulant très net sur l'expression de messenger intégrine $\alpha 2$. Seule la formulation F1 a montré une légère tendance, au temps 72 h seulement (+17 % par rapport au témoin).

Intégrine $\beta 1$

Les traitements n'ont pas montré d'effet stimulant très net sur l'expression du messenger intégrine $\beta 1$.

La formulation F1 a eu tendance à stimuler l'expression à 18 h (+16 % par rapport au témoin) et à 72 h (+12 %). F2 a aussi eu tendance à stimuler l'expression, au temps 72 h seulement (+12 % par rapport au témoin).

Collagène IV (chaîne $\alpha 2$)

Les formulations F1 et F4 ont eu tendance à stimuler l'expression au temps 18 h (de l'ordre de +20 % du témoin). Tous les traitements ont inhibé l'expression de collagène IV au temps 72 h ; cet effet est apparemment relié à une forte intensité de marquage du collagène IV dans le placebo, à 72 h.

Effets sur la quantité de marqueurs protéiques, western blot

Les résultats sont donnés en chiffres relatifs par rapport à l'actine versus placebo, après analyse densitométrique des bandes immunodétectées.

Traitement	Intégrine $\alpha 2\beta 1$	Collagène IV
P0 à 18H	0	0
F1 à 18H	+90%	+53%
F2 à 18H	+87%	+5%
F3 à 18H	+34%	-8%
F4 à 18H	-3%	-8%
P0 à 72H	0	0
F1 à 72H	+33%	+10%
F2 à 72H	+47%	+6%
F3 à 72H	+48%	+44%
F4 à 72H	-34%	+31%

Pour mémoire $F3 = F1 + F2$

L'analyse immunoenzymatique a été effectuée sur des fractions protéiques repurifiées et après séparation par SDS-PAGE.

5

Actine (référence)

La bande d'actine était parfaitement nette et relativement homogène à l'intérieur de chaque groupe d'échantillons (18 h et 72 h ; un gel par temps de traitement).

10

Intégrine $\alpha 2\beta 1$

Contrairement au cas des autres anticorps utilisés, le mélange d'anticorps anti-intégrines a généré un important bruit de fond rendant difficile l'interprétation des résultats.

15

Il apparaît cependant que les formulations F1, F2, F3 ont eu tendance à augmenter l'intensité du signal $\alpha 2\beta 1$.

Collagène IV

20 Les extraits d'épidermes traité par F1 pendant 18 h présentent une intensité du marquage du collagène IV supérieure à celle des témoins (+53 % par rapport au témoin). L'effet était moins net au temps 72 h. Ces résultats confirment ceux obtenus par northern blot.

Les traitements par F3 et F4 ont au contraire eu tendance à stimuler la production de collagène IV après le double traitement de 72 h.

Conclusions :

- 5 Dans le test western blot, l'acide ursolique et le palmitoyl pentapeptide augmentent tous les deux la néosynthèse d'intégrine $\alpha 2\beta 1$, sans avoir d'effet synergique entre eux. Dans ce modèle, ces deux composés ont une faible action chacun sur la néosynthèse de collagène IV ; par contre, à 72 heures, ils ont une forte action synergique quand on les utilise ensemble.
- 10 Quand à l'extrait peptidique de lupin blanc, s'il a une action négligeable sur la néosynthèse d'intégrine $\alpha 2\beta 1$, par contre il a à 72 heures une très bonne activité sur la néosynthèse du Collagène IV.

- 15 Expérimentation 3 : essai avec 3 composés en mélange en comparaison avec les composés séparés, selon le même protocole que ci-dessus et en procédant uniquement à l'analyse de l'expression du collagène IV.

On a testé les produits suivants

- Placebo : appelé Po
- 20 - Formulation 1 : Acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium à 0,1% appelé F1
- Formulation 2 : Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser à 3% appelé F2
- Formulation 3 : mélange d'acide ursolique/acide oléanolique, sel de sodium à
- 25 0,1% et de Gel de palmitoyl pentapeptide -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser à 3% appelé F3
- Formulation 4 : Extrait de lupin blanc à 1% appelé F4
- Formulation 5 = F1+F4 appelé F5
- Formulation 6 = F2+F4 appelé F6
- Formulation 7 = F1+ F2+ F4 appelé F7
- 30 en solution aqueuse dans 10 % final de PEG 400

Résultats (analyse par Western blot versus placebo) :

Traitement	Collagène IV
P0	0%
F1	+32%
F2	-1%
F3	+25%
F4	+3%
F5	+61%
F6	+60%
F7	+101%

Conclusions

Parmi les 3 composés, l'acide ursolique/oléanolique montre une augmentation de la néosynthèse de collagène IV par rapport au placebo, tandis que le mélange des trois composés montre une augmentation de la néosynthèse de collagène IV significativement plus importante avec un effet synergique évident.

Expérimentation 4 :

10

On a étudié les effets de la composition de l'exemple 1 sur une population de 40 femmes caucasiennes d'âge moyen 46 ans, dont 3 de phototype II, 18 de phototype III et 19 de phototype IV et concernant le type de peau : 36 à peau mixte et 4 à peau mixte à tendance grasse.

15

Les expérimentatrices ont procédé à une application biquotidienne de la composition de l'exemple 1 pendant 8 semaines, en quantité usuelle, au niveau du visage dans son ensemble, contour des yeux et cou.

On a procédé à un contrôle de la tolérance et à une évaluation de l'efficacité par l'investigateur,

20

- des empreintes cutanées,
- des mesures cutométriques,
- des macrophotographies à titre illustratif,
- un questionnaire d'auto-évaluation complété par les volontaires.

Le déroulement de l'essai était le suivant :

Etat initial, S0 :

- examen médical d'inclusion,
- vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion,
- 5 - cotation clinique initiale des signes fonctionnels et physiques de tolérance locale et de l'état cutané avant traitement,
- empreintes cutanées au niveau de la patte-d'oie,
- mesures cutométriques au niveau de la pommette,
- macrophotographies de la patte-d'oie chez 15 volontaires.

10

Après 4 semaines de traitement (28 jours), S4 :

- cotation clinique intermédiaire des signes fonctionnels et physiques de tolérance locale et d'efficacité,
- empreintes cutanées au niveau de la patte-d'oie,
- 15 - mesures cutométriques au niveau de la pommette,
- auto-évaluation intermédiaire par les volontaires.

Après 8 semaines de traitement (56 jours), S8 :

- cotation clinique finale des signes fonctionnels et physiques de
- 20 tolérance locale et d'efficacité,
- empreintes cutanées au niveau de la patte-d'oie,
- mesures cutométriques au niveau de la pommette,
- macrophotographies de la patte-d'oie chez 15 volontaires,
- auto-évaluation finale par les volontaires.

25

Les résultats obtenus sont les suivants :

L'examen d'efficacité montre à l'issue de 8 semaines d'applications biquotidiennes de la composition de l'exemple 1 :

- une diminution significative de la laxité cutanée, dès le premier
- 30 mois de traitement,
- une diminution du nombre de ridules, significative à partir du deuxième mois de traitement,

- une diminution significative de la profondeur de ces ridules dès le premier mois,

- une diminution de leur longueur, significative au cours du deuxième mois.

5 L'ensemble des paramètres analysés sur les empreintes cutanées de la patte-d'oie montre une évolution favorable au cours des 8 semaines de traitement, avec en particulier une diminution statistiquement significative de la rugosité moyenne, une diminution notable de l'écart maximum, et une diminution significative de la proportion de sillons de profondeur moyenne
10 (Classe 2).

Les mesures cutométriques permettent d'objectiver de manière statistiquement significative une peau plus tendue, moins fatigable et plus tonique ; ces effets, caractérisant une amélioration de la fermeté de la peau, sont significatifs dès le premier mois de traitement.

15 Enfin, les questionnaires d'auto-évaluation reflètent une perception très favorable de la composition de l'exemple 1 par une très forte majorité des volontaires, aussi bien en ce qui concerne ses qualités cosmétiques que son efficacité ; elle est jugée efficace ou très efficace en tant qu'anti-rides et raffermissant par 91% des sujets, et 87.5% des volontaires achèteraient ce
20 produit qu'elles ont noté 8/10 en moyenne.

Expérimentation 5 :

On a étudié les effets de la composition de l'exemple 2 sur une
25 population de 34 femmes caucasiennes d'âge moyen 52 ans, dont 17 de phototype III et 17 de phototype IV et concernant le type de peau : 15 à peau légèrement sèche et 19 à peau modérément sèche.

Les expérimentatrices ont procédé à une application biquotidienne de la composition de l'exemple 2 pendant 8 semaines, en quantité usuelle, au
30 niveau du visage dans son ensemble, contour des yeux et cou, ainsi qu'au niveau d'un avant-bras.

On a procédé à un contrôle clinique de la tolérance et à une évaluation de l'efficacité par,

- des empreintes cutanées,
- des mesures cutométriques,
- des macrophotographies à titre illustratif,
- un questionnaire d'auto-évaluation complété par les volontaires.

5

Le déroulement de l'essai était le suivant :

Etat initial, S0 :

- examen d'inclusion,
- vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion,
- 10 - cotation clinique initiale des signes fonctionnels et physiques de tolérance locale et de l'état cutané avant traitement,
- empreintes cutanées au niveau de la patte d'oie,
- mesures cutométriques au niveau de la pommette,
- macrophotographies de la patte d'oie chez 15 volontaires,

15

Après 4 semaines de traitement (28 jours), S4 :

- cotation intermédiaire des signes fonctionnels et physiques de tolérance locale et d'efficacité,
- empreintes cutanées au niveau de la patte d'oie,
- 20 - mesures cutométriques au niveau de la pommette,
- auto-évaluation intermédiaire par les volontaires.

Après 8 semaines de traitement (56 jours), S8 :

- cotation clinique finale des signes fonctionnels et physiques de
- 25 tolérance locale et d'efficacité,
- empreintes cutanées au niveau de la patte d'oie,
- mesures cutométriques au niveau de la pommette,
- auto-évaluation finale par les volontaires.

30

Les résultats obtenus sont les suivants :

L'efficacité anti-rides est cliniquement caractérisée par une diminution significative de la laxité cutanée, de la quantité de ridules et de leur profondeur ; ces améliorations sont statistiquement significatives dès le premier

mois de traitement. Une diminution de la longueur des sillons s'amorce également de façon significative au cours du deuxième mois de traitement.

L'ensemble des paramètres analysés sur les empreintes cutanées de la patte-d'oie évolue favorablement au cours des 8 semaines de traitement, avec en particulier une diminution significative de la longueur développée, du nombre total de sillons et de la proportion de sillons de profondeur moyenne, ces évolutions intervenant au cours des 4 premières semaines de traitement.

Les mesures cutométriques permettent d'objectiver de manière statistiquement significative une peau plus tonique, moins fatigable et plus tendue ; l'amélioration de la tonicité et les effets tenseur et « anti-stress » se manifestent dès la 4^{ème} semaine d'applications de façon statistiquement significative.

Enfin, les questionnaires d'auto-évaluation reflètent une perception très favorable du produit testé par une très forte majorité des volontaires, aussi bien en ce qui concerne ses qualités cosmétiques que son efficacité ; il est jugé efficace ou très efficace en tant qu'hydratant, anti-rides et raffermissant par 91% des sujets. 82% des volontaires achèteraient ce produit qu'elles ont noté 8/10 en moyenne.

REVENDICATIONS

1. Une composition cosmétique renfermant au moins un composé stimulant la néosynthèse d'au moins un élément important de la jonction dermo-épidermique.
5
2. Une composition cosmétique selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit composé stimule la néosynthèse d'au moins deux, trois éléments importants de la jonction dermo-épidermique.
3. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 et 2,
10 caractérisée en ce que les éléments importants de la jonction dermo-épidermique sont choisis parmi les laminines, l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et le collagène IV.
4. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle renferme de l'acide ursolique ou de l'acide oléanolique.
- 15 5. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle renferme du palmitoyl pentapeptide dans lequel le pentapeptide a la séquence : -Lys-Thr-Thr-Lys-Ser.
6. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle renferme un extrait peptidique de Lupin blanc.
- 20 7. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle renferme de l'acide ursolique qui représente de 0,001 % à 10 % de la composition terminée.
8. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle renferme de l'acide oléanolique qui représente de
25 0,00025 % à 2,5 % de la composition terminée.
9. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle renferme du palmitoyl pentapeptide qui représente de 0,1 à 30 ppm de la composition terminée.
10. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 9,
30 caractérisée en ce qu'elle renferme de l'extrait peptidique de Lupin blanc qui représente de 0,2 % à 10 % de la composition terminée.

11. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle renferme 0,01% à 5% d'acide ursolique ou d'acide oléanolique associé à 0,1 à 30 ppm de palmitoyl pentapeptide.

12. Une composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 5 11, caractérisée en ce qu'elle renferme 0,2% à 2% d'acide ursolique ou d'acide oléanolique associé à 1 à 10 ppm de palmitoyl pentapeptide.

13. Utilisation d'un composé stimulant la néosynthèse d'au moins un éléments important de la jonction dermo-épidermique tel que des laminines, et/ou de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et/ou du collagène IV, dans la lutte tant curative que 10 préventive contre les effets du vieillissement cutané.

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2813018

N° d'enregistrement
nationalFA 591307
FR 0010773

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR 2 779 058 A (PARFUMS CHRISTIAN DIOR) 3 décembre 1999 (1999-12-03) * le document en entier * ---	1-3,13	
X	WO 96 25143 A (LVMH RECHERCHE) 22 août 1996 (1996-08-22) * le document en entier * ---	1-3,13	
X	FR 2 779 059 A (GUERLAIN) 3 décembre 1999 (1999-12-03) * le document en entier * ---	1-3,13	
E	FR 2 797 186 A (SILAB) 9 février 2001 (2001-02-09) * le document en entier * ---	1-3,13	
X	WO 98 13019 A (UNILEVER) 2 avril 1998 (1998-04-02) * le document en entier * ---	1,4,7,8, 13	
X	FR 2 152 365 A (SERDEX) 27 avril 1973 (1973-04-27) * le document en entier * ---	1-4,7,8, 13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	DATABASE CAPLUS [en ligne] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; retrieved from STN Database accession no. 1999:49152 XP002169195 * abrégé * & JP 11 012122 A (POLA CHEMICAL INDUSTRIES) 19 janvier 1999 (1999-01-19) ---	1-4,7,13	A61K
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 juillet 2001		Fischer, J.P.	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2813018

N° d'enregistrement
national

FA 591307

FR 0010773

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; LEE HO-YOUNG ET AL.: "Induction of differentiation in the cultured F9 teracarcinoma stem cells by triterpene acids." Database accession no. PREV199497465087 XP002169196 * abrégé *</p> <p>& JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, vol. 120, no. 9, 1994, pages 513-518, ---</p>	1-4,7,8, 13	
X	<p>FR 2 783 169 A (SEDERMA) 17 mars 2000 (2000-03-17) * le document en entier *</p> <p>---</p>	1-3,5,9, 13	
E	<p>WO 00 62743 A (PROCTER & GAMBLE) 26 octobre 2000 (2000-10-26) * revendications 1-10; exemples 1-17 *</p> <p>---</p>	1-3,5,9, 13	
E	<p>FR 2 792 202 A (LABORATOIRES PHARMASCIENCES) 20 octobre 2000 (2000-10-20) * le document en entier *</p> <p>---</p>	1-3,6, 10,13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	<p>FR 2 778 565 A (SILAB) 19 novembre 1999 (1999-11-19) * le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-3,6, 10,13	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 juillet 2001		Fischer, J.P.	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C

Numéro de la demande

FA 591307
FR 0010773

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait
l'objet de recherches complètes:
aucune

Revendications ayant fait
l'objet de recherches incomplètes:
1-13

Raison:

Les revendications 1-13 ont trait à une très grande variété de composés (composé stimulant la néosynthèse d'au moins un élément important de la jonction dermo-épidermique) Un fondement et/ou un exposé ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible.

Par conséquent la recherche a été effectuée pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les composés cités dans la description et les revendications et dans l'esprit général de l'invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)